

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



30. Juni 1998
091424840

REC'D 11 AUG 1998
WIPO PCT

Bescheinigung

Die ASAT AG Applied Science & Technology in Zug/Schweiz hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Antikörper"

am 6. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, C 12 P und C 07 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 19. Juni 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

zeichen: 197 23 904.8

Brand

PATENTANWÄLTE

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621
TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

6. Juni 1997

Unser Zeichen:
16824P DE/WWvo

beijerentz

Anmelder:
ASAT AG
Applied Science & Technology
Baarerstrasse 77



6302 Zug
Schweiz

Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B.

20

Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990), 83-95).

25

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise

gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten 5 Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.

10 Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plättchenzahlen aufweisen, wird als Notfallbehandlung die Verabreichung hoher 15 Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74 20 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.

25 Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.

30 Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-

Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 5 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthe-
nischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen
10 Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden
der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone
erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien
unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben
zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale
15 Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und
eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper.
Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das
Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab.
Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h.
20 Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden
können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes
erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt,
daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Auto-
antikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und
25 somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die
Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper
enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser
Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assozierter
Autoantikörper in AITP führen.

30

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-
Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-

GPIIb/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

5

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8 dargestellt.

10

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

15

V L P F D P I S M D V (I)

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

A L G S W G G W D H Y M D V (II)

kodierenden Nukleotidsequenz,

20

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und

(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

25

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

G Y S W R (III)

30

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

S Y A M H (M)

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt:

10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
D I S Y S G S T K Y K P S L R S (M)
kodierenden Nukleotidsequenz,
v
(b) einer für die Aminosäuresequenz:
V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (M)
kodierenden Nukleotidsequenz und
15 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

20 Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
A T W D D G L N G P V (VII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A A W D D S L N G W V (VIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

30 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von

mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert und

(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
CDR1-Region ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

S G S S S N I R S N P V S (IX)

10

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

S G S S S N I G S N T V N (X)

kodierenden Nukleotidsequenz und

15

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

15

Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise
20 weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

G S H Q R P S (XI)

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

S N N Q R P S (XII)

kodierenden Nukleotidsequenz und

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

25

30

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und zusammen mit der 5 jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivat eine 10 Bindungskonstante von mindestens 10^{-6} l/mol, vorzugsweise von mindestens 10^{-8} l/mol für das jeweilige Antigen auf.

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch 15 rekombinante DNA-Techniken erfolgen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen Domänen der H- und L-Kette sowie gegebenenfalls einer konstanten 20 Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun, Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epitoperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer

Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder ein Phage.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugerzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon

als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper
5 gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung
des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser
Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper
oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B.
10 ein Fab-, F(ab)₂-, Fab'- oder F(ab')₂ Fragment) sein. Vorzugsweise ist der
Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten
Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich
davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten
Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder
Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und
15 Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier
erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion
einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer
Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer
Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können
20 rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungs-
gemäßen Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten
Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageimid-Bibliothek aus einem gesunden
humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungs-
gemäßes Polypeptid verwendet wird.

25 Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die
eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine
Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen
mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-,
30 Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung 5 ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation 10 umfassen, welche ein erfindungsgemäßen Polypeptid als Antikörper exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen 15 oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann 20 beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungsgemäße Polypeptid einem Patienten verabreicht werden, wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen Immunisierungs- 25 protokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996), 1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121; Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden.

30 Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele und Sequenz-protokolle erläutert. Es zeigen:

SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplement-bestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357 reicht,

5

SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,

10

SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

15

SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-11 reicht,

20

SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

25

30

SEQ ID No. 6 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

5

SEQ ID No. 7 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

10

SEQ ID No. 8 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-111 reicht.

15

Beispiele

20

1. Gewinnung von Autoantikörpern

Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

25

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch (Plättchenzahl < 150 x 10⁹/l) und hatten normale oder vergrößerte

30

Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren Formen der Immunthrombozytopenie.

2. Gewinnung gereinigter Antigene

5

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment von GPIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von GPIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51 und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

10

3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting

Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humander Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation 15 hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.

20 Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

4. Monoklonale Antikörper

25

Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexe Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene 30 gewonnen und sind nicht AIITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et

al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

5. Phagemid-Bibliothek

5

Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide 10 wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer für die PCR-Amplifikation der H- und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helferphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von 15 Stratacyte (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylen- 20 glykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält 1×10^7 Spezifitäten.

6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer 25 Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative Selektion) mit 5×10^7 thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit 10^8 normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 30 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden

wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay ermittelt. 1 μ l normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 ml) sowie gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1% Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- α -naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nachgewiesen.

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftröpfen getestet.

Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffinität für GPIIb/IIIa aufweisen.

7. Fab Analyse

Zum Test der positiven Phabs auf kappa (κ), lambda (λ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter 5 wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- λ -, - κ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 10 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemielumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf κ , λ und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der λ -Kette in allen 15 Klonen.

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen 20 erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis 3×10^4 Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

25

8. Charakterisierung der Phab-Bindeepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter 25 Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1 μ l aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen (10⁹/ml), gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml), ein Peptidfragment von GPIIa (Aminosäuren 468-690, 500 μ g/ml) und der cytoplasmatische Abschnitt von 30 GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone (0,4 μ g/ml Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- α -naphthol nachgewiesen.

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig 5 durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem 10 GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert \pm SD in %)				
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n = 5)		Gruppe B Phab Klone (n = 10)	
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa
(1) Anti-GPIIb	0	0	49,1 \pm 5,9	49,4 \pm 9,2
(2) Anti-GPIIa	0	0	0	0
(3) Anti GPIIb/IIIa- Komplex	77,8 \pm 2,9	43,6 \pm 2,1	58,6 \pm 4,4	45,5 \pm 8,0
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 \pm 7,7	33,0 \pm 10,8	95,9 \pm 2,7	97,5 \pm 7,5

9. Inhibierungsuntersuchungen

5 Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsuntersuchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifizierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.

10 Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosesstreifen getropft und die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit 10^{11} 15 Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nachgewiesen.

20 Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis 60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs. Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von 25 Patienten mit primärer und krankheitsassozierter AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

		Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
AITP-Patient		Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klonen
5	WS16	13	19	40
	WS37	14	20	36
	KC	24	22	28
	KK	22	22	40
	KP	10	36	60
	WS2	25	55	65
	KS	60	56	64
	KL	0	15	10
	KG	0	0	0
	KM	0	0	0
10	KE	0	0	0
	KR	0	0	0

10. DNA Sequenzanalyse

20 Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenziersystem unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Ch γ 1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'): Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: C λ (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), C κ (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und V λ Familien zugeordnet.

Die VH und V λ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzi-dentität mit dem Stammlinienengen VH4.11 der V_H4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V_H3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammlinienengensequenz der DPL2 der V_λ 1 Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 323 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
Klone	FR1												
VH4.11	QVQLQESGGPVGVKPESTLSLTLCTVSGGSIS	SYWS G-S-R	WIRQDPGKGLEWIG ---S-	YIYSGSTNYPNSLKS D-S----K-K---R		RVITISVDTSKNQFSULKSSVTAADTAVVYCAR ---L-----N				VLPFDPISMDV VLPFDPISMDV		WGKGTTTVSS WGKGTTTVSS	
PDG7	--K-L-----N-----R---												
PDG8													
PDG10													
PDG16													
1.9III													
PDG13	QVQLVSEGGGVVQPGRSIRLRLSCNAASGFTFS -K-L-----	SYGMII --A--	WYRQAPGKGLEWVA ---	VISYDGSNKKYAADSVKG ---		RF71SRDNISKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCK --A-----				ALGSWGGHDIIYMDV ALGSWGGHDIIYMDV		WGKGTTTVSS WGKGTTTVSS	
PDG17													
PDG31													
PDG37													
M85255	--Q-V-----												
B. Leichte Ketten													
Klone	FR1		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4
DPL2	VLTQPPSASGTPGQRTVISC -V-----W-----	SGSSSNIGSNTVN ---R--P-S	WYQQLPGTAKPLLIY --II-V-----F	SNNQREPS GSII-----		GVPDRFSGSKSGTSASLAIISGLOSEDEADYC -----R----G-AG-----				AAWDDSLNG -T-----PV			
PDG7													
PDG8													
PDG10													
PDG16													
DPL2	VLTQPPSASGTPGQRTVISC -V-----	SGSSSNIGSNTVN ---	WYQQLPGTAKPLLIY ---	SNNQREPS ---		GVPDRFSGSKSGTSASLAIISGLOSEDEADYC -----				AAWDDSLNG -----WV			
PDG13													
PDG17													
PDG31													
PDG37													

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9III; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche 20 bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIIb-Autoantikörpers 2E7 (Kuricke et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

5 Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten
10 Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

5	PDG- Phab- Klone	Schwere Kette			Leichte Kette		
		V _H Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V _λ Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (5)
10	Gruppe A: 7,8, 10, 16	V _H 4	V _{H4} .11	84,3	V _λ I	DPL2	81,4
15	Gruppe B: 13, 17,31, 37	V _H 3	1,9III	95,1	V _λ I	DPL2	97,1

Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, 5 ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
 - (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,
 - (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
kodierenden Nukleotidsequenz,
 - (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und
15
 - (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIb/IIIa kodiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:
25
 - (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
 - (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)
kodierenden Nukleotidsequenz und

15 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
A T W D D G L N G P V (VII)
25 kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A A W D D S L N G W V (VIII)
30 kodierenden Nukleotidsequenz,

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und

5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:

10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,

15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:

25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,

30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XIII)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5 7. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält.

10 8. Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 exprimiert.

15 9. Polypeptid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 kodiert ist.

20 10. Polypeptid nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.

25 11. Polypeptid nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable Domäne der L-Kette umfaßt.

12. Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.

- 5 13. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 12.

14. Antikörper nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten
10 Antikörperkette des Polypeptids gerichtet ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine
Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, einen Vektor nach
Anspruch 7, eine Zelle nach Anspruch 8, ein Polypeptid nach einem
der Ansprüche 9 bis 12 oder einem Antikörper nach einem der
Ansprüche 13 oder 14, gegebenenfalls zusammen mit anderen
aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz-
oder Trägerstoffen enthält.

- 20 14. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
eines Vektors nach Anspruch 7, einer Zelle nach Anspruch 8, eines
Polypeptids nach einem der Ansprüche 9 bis 12, eines Antikörpers
nach Anspruch 13 oder 14 oder einer pharmazeutischen Zusam-
men-
setzung nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Mittels für die
25 Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von ATP.

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

vo 06.06.97 11:54

SEQ'JEN? PROTOFOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(: BEN ZU SEQ ID NO: 1:

SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLSSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..357

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

C	TG AAA CTG CTC GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG	48
	1 Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
	5 10 15	
ACC	TCC CTC AAC TGC ACT GTC TCT GGT CGC TCC ATC AGT GGT TAC	96
Thr	Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr	
	20 25 30	
TCT	TGG AGA TGG ATC CGG CAG TCT CCA GGG AAG GGA CTA GAG TGG ATT	144
Ser	Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
GGG	GAT ATC TCT TAT AGT GGG AGT ACC AAG TAC AAA CCC TCC CTC AGG	192
Gly	Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg	
	50 55 60	
AGT	CGA GTC ACC CTG TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG	240
Ser	Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	
	65 70 75 80	
AAG	CTG AAT TCG GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCG	288
Lys	Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
	85 90 95	

CGA GTC TTG CCC TTT GAC G G ATC TC; A T G GAC GTC TGG G C AAA GGG
Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Sec Met Asp Val Trp Gly Lys Gly
100 103 110

336

ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

357

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LANGE: 119 Aminosuren
(B) ART: Aminosure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Trp Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Ser Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LANGE: 333 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLSSSEL: CDS
(B) LAGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTC GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG TGG GTC
Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Trp Val
120 125 130 135

48

ACC ATC TCT TGT TCT GGG AG[REDACTED]GC TCC AAC ATC AGA AGT AA[REDACTED]CCT GTF	96
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Pro Val	
140 145 150	
AGC TGG TAT CAC CAG GTC CCA GGC ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TTT	144
Ser Trp Tyr His Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe	
155 160 165	
GGT AGT CAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC	192
Gly Ser His Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
170 175 180	
AAG TCG GGC ACC TCC GCC TCC CTG GCC ATC CGT GGG CTC CAA TCT GGG	240
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly	
185 190 195	
GAT GCT GGT GAC TAT TAC TGT GCA ACA TGG GAT GAC GGC CTC AAT GGT	288
Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly	
200 205 210 215	
CCG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA AGT CAG CCC	333
Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro	
220 225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 111 Aminosuren
- (B) ART: Aminosure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Trp Val	
1 5 10 15	

Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Pro Val	
20 25 30	

: Asp Tyr His Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe	
35 40 45	

Gly His Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly	
65 70 75 80	

Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly	
85 90 95	

Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro	
100 105 110	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLSSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg 115 120 125	48
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 130 135 140	96
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 145 150 155	144
GC ^A GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG Al Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 165 170 175	192
AAG CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 180 185 190	240
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 195 200 205	288
GCG AGA GCG CTG GGG AGC TGG GGG GGT TGG GAC CAC TAC ATG GAC GTC Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val 210 215 220	336
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 225 230	369

(i) BEN ZU SEQ ID NO: 6:

.1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LNGE: 123 Aminosuren
 (B) ART: Aminosure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60

Lys ~~Gly~~ Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn T Leu Tyr
•65 , , 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(i) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLSSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC 48
Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val
125 130 135

ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA 96
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val
140 145 150 155

AAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT 144
Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
160 165 170

² S. AAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC 192
Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
175 180 185

AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG 240
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu
190 195 200

GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AAT GGT 288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
205 210 215

TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC 333
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
220 225 230

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LNGE: 111 Aminosuren
- (B) ART: Aminosure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val
1 5 10 15

Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
85 90 95

T₁ Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110